NOMBRE: Escobar Torres María Paloma
DOMICILIO: Av. Taller rtn 14 #5 Col. Jardín Balbuena
DELEGACIÓN: Venustiano Carranza
TELÉFONO: 55 52 49 42
NÚMERO DE CUENTA: 9336149-3

DOMICILIO DE LA INSTITUCIÓN RESPONSABLE

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

(CINVESTAV) Av Instituto Politécnico

Nacional # 2508 Col. San Pedro Zacatenco , México, D.F. cp. 07360

RESPONSABLE DEL PROGRAMA: Dr. José Segovia Vila

TELÉFONO: 57 47 38 00 ext: 5132

NOMBRE DEL PROGRAMA: Neurociencias

CLAVE: 2000-0038/0001-5561

INSTITUCIÓN RESPONSABLE: CINVESTAV

Nombre del proyecto: **Obtención de vectores retrovirales que expresan las proteinas amarilla y azul fluorescentes**

_____

Dir. De Tesis: Dr. José Segovia Vila
Investigador titular
Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencia
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Del Instituto Politécnico Nacional
e-mail: jsegovia@fisio.cinvestav.mx

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCIÓN ---------- **1-15**

OBJETIVOS ---------- ***16***

METODOLOGÍA ---------- ***17-20***

RESULTADOS ---------- ***21-26***

DISCUSIÓN ---------- ***27-30***

CONCLUSIONES ---------- ***31***

BIBLIOGRAFÍA ---------- **31-34**

INTRODUCCIÓN

TRANSFERENCIA GÉNICA

La introducción de material genético con fines experimentales y terapéuticos se conoce como transferencia de genes. Los métodos de transferencia de genes incluyen sistemas virales y no virales. Los métodos de transferencia más eficientes incluyen los virus modificados, como los retrovirus en donde se insertan los genes eliminando parte del genoma viral.

SISTEMAS DE TRANSFERENCIA DIRECTA *(in vivo)*

En esta modalidad los genes son transferidos directamente a las células o tejidos en el organismo donde se pretenden ser expresados, la transferencia directa de genes implica la microinyección del sistema que exprese el transgén de interés a través de métodos no virales, como los liposomas, sin embargo se ha probado que éstos sistemas tienen una baja eficiencia.

SISTEMAS VIRALES

ADENOVIRUS

Uno de los métodos más utilizados para transferir genes son los adenovirus. Son capaces de infectar tanto células diferenciadas como en proliferación. Pueden contener secuencias más largas que los retrovirus, sin embargo, el genoma adenoviral no se integra al genoma de la célula anfitriona por lo que la expresión del transgén es generalmente corta además de que en estos sistemas a diferencia de los retrovirales, sí se sintetizan proteínas virales las cuales al ser reconocidas por el sistema inmune ocasionan una fuerte respuesta.

VIRUS ADENOASOCIADOS

Los virus adenoasociados (AAV) son capaces de infectar un amplio número de hospederos, de integrarse en el genoma de la célula y de expresarse en células post-

mitóticas, sin embargo, generalmente requieren de ciertas proteínas que se derivan de los adenovirus, herpes virus, citomegalovirus o del virus del herpes humano-6 para terminar su ciclo de vida. Además presentan el riesgo de generar virus con replicación competente. Los vectores AAV son producidos por medio de plasmidos que expresan los genes *rep y cap.* El uso de altas concentraciones de *rep* es tóxico lo que dificulta la construcción de células empacadoras que expresen establemente los genes *cap y rep* (Slack y Miller, 1995).

DERIVADOS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1 (HSV-1)

Este tipo de virus tiene preferencia por las neuronas, no se integran en el genoma celular. Sin embargo el HSV-1 es un patógeno humano que puede causar encefalitis. A partir del HSV-1 se han generado dos tipos de vectores: No líticos recombinantes y los amplicones basados en plasmidos que necesitan de virus ayudantes llamados "helper" necesarios para la replicación del DNA. Los HSV-1 no líticos recombinantes aceptan insertos de más de 30 Kb, pero se ha demostrado que poseen cierta citotoxicidad.

Los amplicones son generados a partir de plásmidos que contienen un "cassette" de expresión y secuencias de replicación del DNA viral. En la actualidad se han generado amplicones que no necesitan virus, utilizan cósmidos que proveen los genes necesarios para la replicación. El vector puede aceptar un inserto de 15 Kb. Sin embargo se ha visto que los títulos virales son bajos y los amplicones no son fácilmente purificados de los virus ayudantes (Frieddmann,1994)

RETROVIRUS

Los retrovirus son virus de RNA y para penetrar a las células blanco reconocen receptores específicos de membrana. Al entrar al citoplasma, el genoma de RNA viral es transcrito a DNA e integrado en el cromosoma en donde se replica y produce nuevas partículas virales.

(Figura 1)

Los retrovirus han evolucionado de tal manera que son capaces de integrar su genoma eficientemente dentro de la célula anfitriona, en donde permanecen y se replican junto con ella **.**

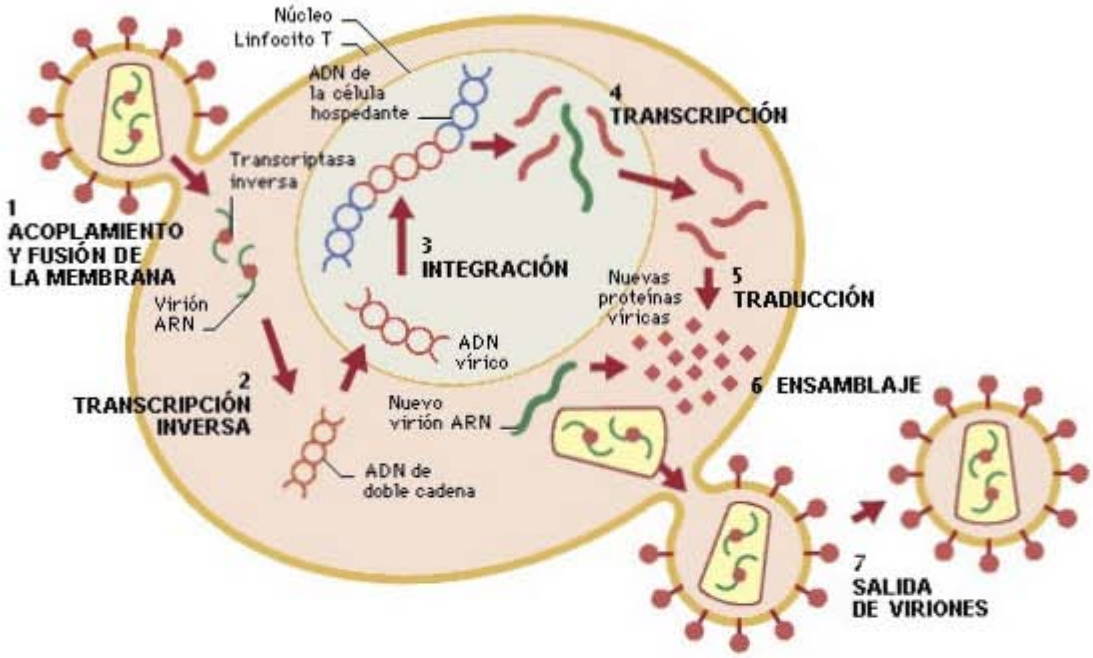


Figura 1: muestra el ciclo de vida de un retrovirus en estado silvestre. **1.** El virus reconoce los receptores de membrana e introduce el RNA viral al citoplasma por medio de endosomas**. 2.** Se lleva acabo la transcripción inversa en donde el RNA viral es transcrito a cDNA. **3.** Este cDNA o provirus es transportado al núcleo en donde se integra al genoma de la célula. **4.** El provirus es transcrito produciendo los genes estructurales *gag, pol y env* . **5**. Estos genes virales serán traducidos en las proteínas de la capside y empaquetamiento junto con las señales necesarias para producir las nuevas partículas virales. **6.** Estas proteínas son ensambladas. **7.** Finalmente los virus son liberados de la células por medio de lisis

Los retrovirus han sido ampliamente usados en la transferencia de genes para el estudio de una gran variedad de enfermedades. Presentan las ventajas de ser fácilmente manipulables ***in vitro*** , además de que el genoma se integra de manera estable a la célula anfitriona sin presentar una toxicidad aparente. Son capaces de infectar una gran variedad de tipos celulares, (véase revisión de Hee y Kim, 2000). Sin embargo, una de las desventajas en el uso de éste tipo de vectores es que requieren de la división celular para su integración. Se ha observado que se obtienen títulos virales menores en comparación con los adenovirus y que, debido a su inserción azarosa, existe el riesgo de que se integren en genes celulares críticos, induciendo la regulación anormal de algún gen y la posibilidad de formar tumores (Friedmann,1994. Gunzburg y Salmons, 1995, Sokol y Gewirtz, 1996, Slack y Miller, 1996).

VECTORES RETROVIRALES

El desarrollo de vectores retrovirales capaces de infectar un amplio número de tipos celulares ha tenido un gran impacto en áreas de la investigación donde resulta esencial un sistema eficiente de transferencia de genes.

En la actualidad se ha incrementado el uso de vectores retrovirales con fines terapéuticos. Para esto es necesario generar partículas virales en líneas de células empacadoras, como la línea GPE-86, las cuales proporcionan los genes policistrónicos, gag, pol y env en ***trans*** ; cada uno de estos genes codifica para varias proteínas virales; (Gerstmayer et al,1999, L.M. Cashion et al,1999). Las células empacadoras no producen virus por sí mismas; requieren de la infección con un plasmido para empacar los virus deficientes en su replicación.

A pesar de que éstos vectores se han convertido en el principal mecanismo de expresión de transgenes en la terapia génica, uno de los principales esfuerzos se dirige en optimizar este tipo de transferencia a diversas poblaciones celulares (Flasshove et al, 2000). Además de evitar los eventos de recombinación que permitan la producción de virus replicativos y por lo tanto, infecciosos. (Hanazono, et al 1997).

La forma más efectiva de introducir el material genético en las células empacadoras es por medio de una transfección con un plasmido; en la actualidad los liposomas son considerados como una importante alternativa en éstos sistemas de transferencia de genes, se ha probado a la lipofectamina que es un producto comercial de liposomas como una forma eficiente para transfectar (Bell et al, 19998).(Figura 2)

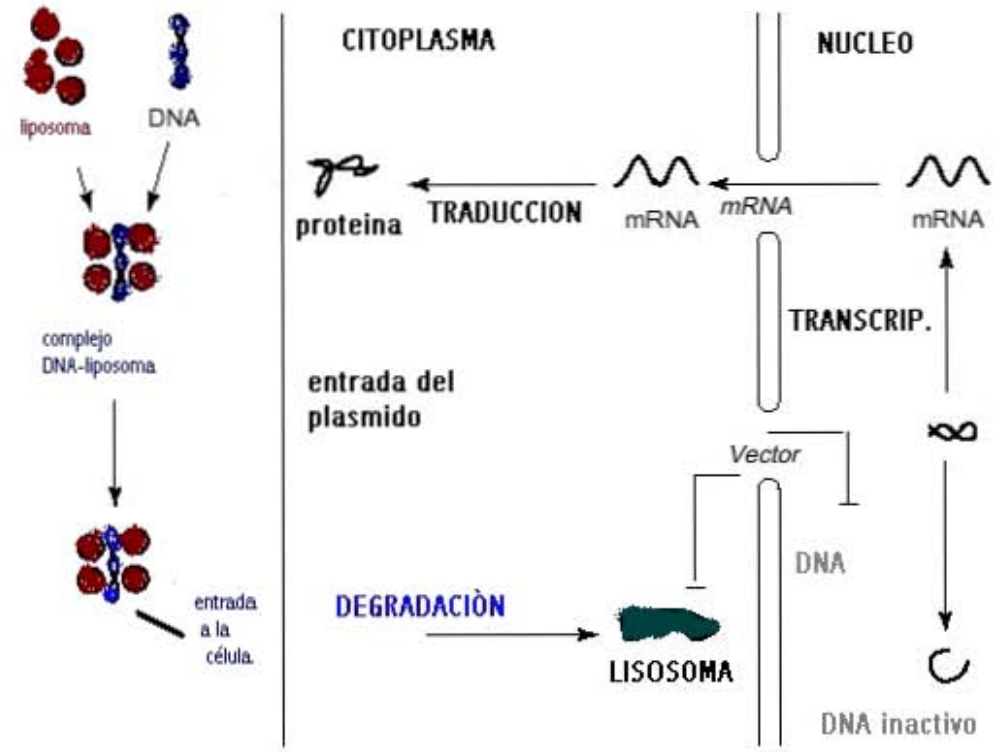


Figura 2: transfección con un plasmido por medio de liposomas

Para identificar las células infectadas se seleccionan por medio de un marcador que generalmente presenta resistencia a algún antibiótico, posteriormente se pueden obtener colonias las cuales se pueden calcular con el título viral, que nos indica la cantidad de partículas infecciosas/ml. (Hanazono et al 1992, Tarutani et al, 1998)

En los vectores retrovirales se eliminan las secuencias *gag, pol y env* y en lugar se coloca al gen terapéutico y un marcador de selección. Los genes estructurales son colocados en ***trans*** en células empacadoras (Friedmann,1994. Gunzburg y Salmons, 1995, Sokol y Gewirtz, 1996, Slack y Miller, 1996). (figura 3)

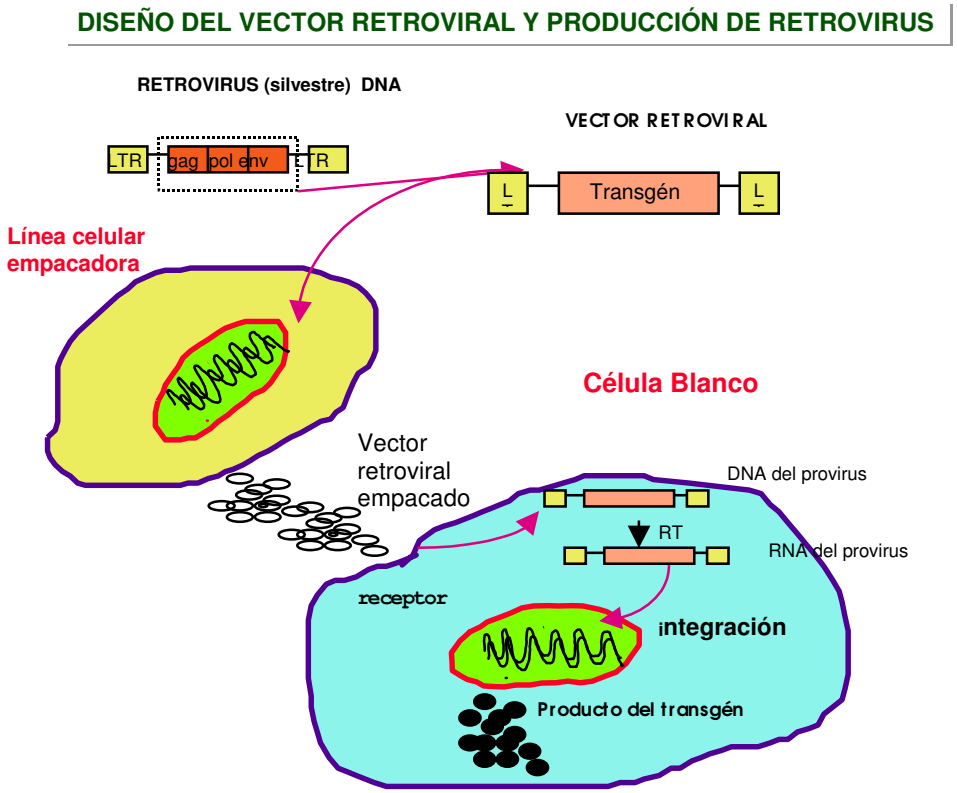


Figura 3: muestra el diseño de un vector retroviral y la producción de retrovirus deficientes en su replicación. Para construir un vector retroviral es necesario eliminar las secuencias codificantes de los genes *gag, pol y env, y* en lugar colocar el gen transgén que va a ser expresado.

Los retrovirus se unen a las células blanco a través de la interacción con los receptores específicos de la proteína viral *Env*, Los retrovirus de murino se han dividido en 6 grupos diferentes debido a que presentan al menos 6 tipos de receptores para su entrada a la célula: ecotrópicos, xenotrópicos, politrópicos, amfotróficos, 10ª 1 y los grupos del virus *Mus dunni*. Estos receptores tienen características distintas. Por ejemplo, la envoltura *Env* del virus ecotrópico MLV en estado silvestre se une a un receptor ecotrópico , un transportador catiónico de aminoácidos que se expresa solamente en células de murino. En contraste, el receptor blanco para el virus MLV de envoltura amfotrófica es un transportador de fosfatos Ram-1 y se expresa en una gran variedad de tipos celulares de diferentes especies. (Seon Hee Kim, et al 2000).

Otras envolturas virales reconocen proteínas específicas de la superficie celular, esto limita la capacidad infecciosa del virus a ciertos tipos celulares que expresan esos receptores específicos. También es posible generar falsas proteínas de envoltura viral, las cuales son capaces de ser blanco de ligandos que se expresan en la superficie de diversos tipos celulares.

La mayoría de los vectores retrovirales empleados experimentalmente se derivan del retrovirus de la leucemia de Moloney (Mo)-MuLV debido a la disponibilidad que ofrecen de obtener variantes de retrovirus además de que no infectan células humanas,. Debe considerarse que la infección está limitada a ciertos tipos celulares que presenten receptores membranales específicos que permiten la entrada del material genético del virus como los roedores. (Anderson et al, 1988, Mc Lachlin et al, 1990). El vector retroviral más comúnmente utilizado está formado a partir del virus de la leucemia de murina de Moloney (MoMLV), aunque se han generado recientemente vectores retrovirales humanos basados en el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH llamados lentivirus. Este vector retroviral infecta solamente células de roedores por lo que se clasifica dentro de los vectores ecotrópicos. Los vectores amfotróficos son capaces de infectar células de la mayoría de las especies, incluyendo humanas. El vector MoMLV contiene regiones largas repetidas llamadas **LTR** en los extremos **5´y 3´**, las cuales llevan al promotor y las señales de inicio y terminación de la transcripción, Estos vectores también contienen regiones para la encapsidación y empaquetamiento del RNA viral llamadas *psi.* El genoma del retrovirus ***silvestre*** tiene un ***LTR 5*** ‘seguido de la secuencia *psi* y los genes policistrónicos gag, pol y env seguidos de una región ***LTR 3´***. (Figura 4).

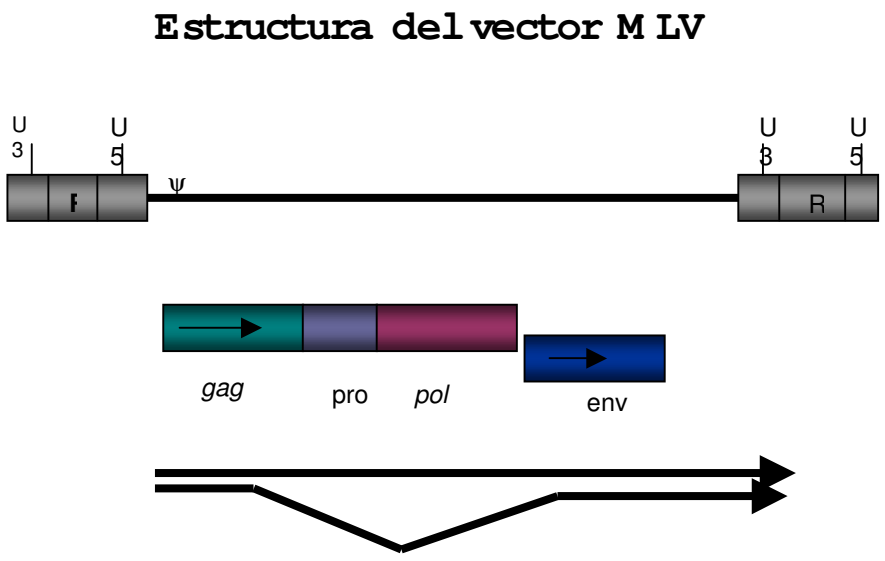


Figura 4: muestra la estructura del virus de leucemia de murino de Moloney (Mo MLV). Indica las regiones codificantes de las proteínas virales (gag, pol y env).

Un avance importante en el diseño de estos sistemas, fue la creación de una línea celular que incluye mutaciones en la región de síntesis de las proteínas virales, estas alteraciones permiten la producción del título viral hasta en más de 10^6 cfu/ml (Miller et al, 1989).

UTILIZACIÓN DE VECTORES RETROVIRALES EN LA TERAPIA GÉNICA

La terapia génica involucra la transducción ***ex vivo*** *o* ***in vivo*** de un gen activo que pueda funcionar en lugar de otro gen inactivo o defectuoso o que genere una nueva función. Las aplicaciones de ésta terapia incluyen el tratamiento de diversas enfermedades, ya sea en desórdenes heredados, como el cáncer, enfermedades causadas por infección viral como el (SIDA), virus de la inmuno deficiencia adquirida (Salmons et al, 1993). Enfermedades neurodegenerativas como el mal de Parkinson y el mal de Huntington , entre otras.

A través del tiempo se han utilizado diversos métodos para monitorear la actividad de un gen en cualquier tipo celular. Se han utilizado genes reporteros, éstos incluyen los genes que codifican para proteínas de fusión con secuencias que codifican para la

β-galactosidasa , luciferasas, acetiltransferasas, fosfatasa alcalina. (Chalfie et al,1994). Sin embargo, para la detección de los productos de éstos genes se necesitan métodos que requieren de sustratos que se adicionan, o cofactores, que limitan su uso.

LÍNEAS EMPACADORAS

Para obtener una línea de células empacadoras es necesario que estas células sean capaces de proveer las proteínas virales *in trans*, esto permite que el RNA que contiene la región *psi* sea empacado. Para esto se requiere de la expresión estable de los genes *gag, pol y env* .

La primera línea de células empacadoras, se obtuvo a partir de una transfección de NIH3t3 con un plasmido (Mo-MuLV) con una mutación simple en la región de empaquetamiento *psi,* lo que evitaba empacar el RNA genómico en viriones, sin embargo permanecían virus competentes en su replicación.

Para reducir éstos riesgos se obtuvieron otras líneas celulares en las que se incluyen las líneas PC-3 , FN-X, GPE-86, entre otras. (Markowitz et al, 1988) .

La Línea empacadora GPE-86 se originó a partir de la transfección con dos construcciones separadas, una que expresa los genes gag y pol y una segunda que expresa el gen env, los cuales están bajo el control transcripcional del mismo promotor, además de una mutación en la región *psi* lo que reduce la posiblidad de traducir las proteínas virales. El inicio del gen gag ha sido reemplazado por un codón de terminación lo que disminuye la posibilidad de recombinación (Dunbar et al, 1995).

PROTEINAS FLUORESCENTES

El fenómeno de luminiscencia es común en una gran variedad de invertebrados marinos. Muchos organismos de la clase cnidaria y quizá todos los ctenóforos emiten luz como una reacción de defensa. Las proteínas responsables de ésta bioluminiscencia han sido caracterizadas y estudiadas; ahora se sabe que la luz que emiten algunos organismos como las medusas, es gracias a la presencia de un grupo de proteínas llamadas proteínas-verde fluorescentes (GFP), Estas proteínas son activadas ***in vivo*** a través de un proceso de transferencia de energía por medio de una luciferasa o debido a la acción de una fotoproteína por iones de Ca^{2+}. La región del cromóforo en las GFP es intrínseca a la estructura primaria de la proteína, por lo que su fluorescencia no requiere de cofactores adicionales.

Las proteínas amarilla y azul fluorescentes son variaciones de GFP por lo que son llamadas proteínas fluorescentes mejoradas (EFP), éstas fueron obtenidas a partir de mutaciones en diferentes regiones de la GFP. Las EFP han sido utilizadas como marcadores celulares principalmente en la detección de genes o proteínas durante el desarrollo embrionario, en la detección de eventos celulares dinámicos durante la división celular o como genes reporteros durante la transferencia génica (Cashion et al, 1999).

PROTEINAS AMARILLA Y AZUL FLUORESCENTES

El plásmido p-EYFP codifica para una proteína fluorescente amarilla-verde y p-ECFP para una proteína azul (Cheng et al , 1986, Yang et al, 1996).

El gen ECFP (Enhanced cyan fluorescent protein) contiene 6 sustituciones con respecto a la GFP, una en el aminoácido Tyr-66 por Trp, lo que le proporciona la excitación fluorescente, en un pico mayor de 453 nm y un pico menor de 434 nm. El espectro de emisión está dado entre las longitudes de onda 477 y 496 nm. Las otras cinco sustituciones (Fe-64 por Leu, Ser-65 por Tre, Asn-146 por Ile, Met-153 por Tre y Val

153 por Ala), proporcionan el brillo y la solubilidad a la proteína así como su gran eficiencia en la formación de cromóforos. El gen EYFP (Enhanced yellow fluorescent protein) contiene 8 sustituciones en los aminoácidos (Fe, Leu, Met, Ser, Tre, Val, Ile, Asn). La excitación fluorescente se presenta en un pico máximo de 513 nm y un pico de 527 nm (en la región amarilla-verde). La región de emisión se encuentra entre 509 y 527nm.

Estos genes se subclonaron en un vector retroviral pLNCX para formar pLNCX-ECFP-N1 en el caso de la proteína azul y pLNCX-EYFP-N1 para la proteína amarilla. La expresión de la proteínas amarilla y azul fluorescentes se encuentra dirigida por el promotor viral CMV, que dirige la expresión de los genes del citomegalovirus humano, contienen un gen resistencia a neomicina y los sitios ***LTR 5´ y 3´*** virales que funcionan como señales de inicio y terminación de la transcripción, además de una señal ***psi*** de empaquetamiento. *(Figura 5)*

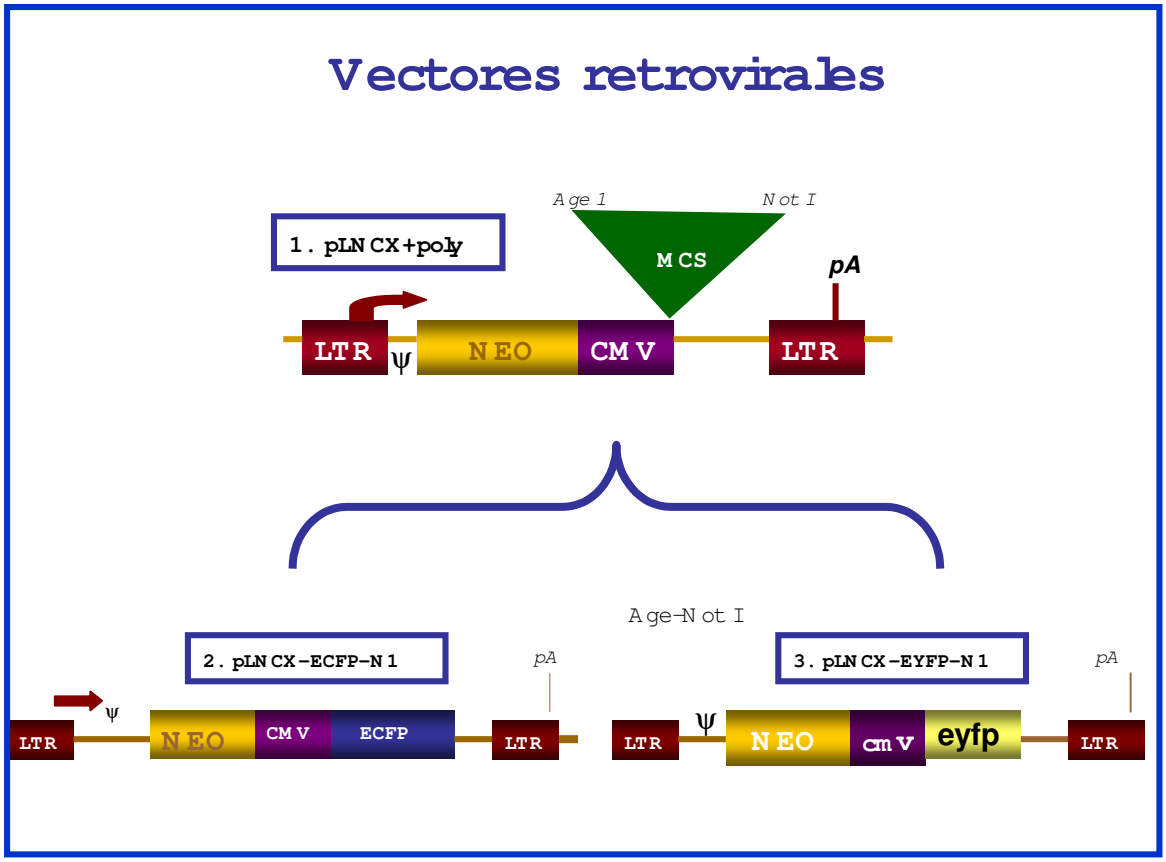


Figura 5: muestra la subclonaciòn de las regiones codificantes yellow y cyan respectivamente en el vector p-LNCX por medio de un sitio de clonación múltiple sintético. (1), se obtuvieron los vectores p-LNCX-ECFP-N1 (2), Y pLNCX-EYFP-N1 (3), ambos bajo el control transcripcional del promotor viral CMV, dentro de las regiones virales LTR 5´y 3´ ademàs de una regiòn *psi* de empaquetamiento y un gen de resistencia a neomicina.

PROTEÍNAS FLUORESCENTES COMO MARCADORES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La proteína verde fluorescente (GFP) obtenida del ctenóforo ***Aequorea victoria*** se ha convertido en un importante marcador de la expresión génica. Se ha encontrado que es superior a otros genes reporteros, como la enzima que codifica para lacZ la cual requiere de reacciones histoquímicas, o de un anticuerpo específico para reconocerla.

La proteína contiene el cromóforo intrínseco a la estructura primaria de GFP por lo que no requiere de cofactores o sustratos adicionales, y su fluorescencia es aparentemente estable (Cheng et al, 1996). En estudios recientes se ha probado el uso de GFP como un marcador vital durante el crecimiento celular, la fluorescencia se ha podido detectar en cultivos celulares (Kitt et al, 1995) a través de microscopía de fluorescencia con un filtro del luz que transmite un rayo azul (-480nm), el cual es requerido para excitar la fluoresceína y así producir un rayo de luz verde .(-530nm).

La detección de la fluorescencia verde que expresa la proteína de GFP se ha demostrado en diversos sistemas celulares incluyendo *E. Coli, C. Elegans, , D, melanogaster* y en células de mamíferos, como los linfocitos genéticamente modificados, y en células hematopoyéticas (Dunbar et al, 1995, Levy et al, 1996, Bierhuizen et al, 1997, Heemskerk et al, 1997, Limón et al, 1997, Persons et al, 1997, Ramiro et al, 1998). También se ha expresado ***in vivo*** en ratones transgénicos que portan la secuencia de la proteína fluorescente que funciona como un gen reportero.

Para mejorar la expresión de GFP en células de mamíferos se ha construído una variante llamada EGFP la cual contiene una mutación en la región del cromóforo lo que hace a la proteína 35 veces más brillante que la ***silvestre*** (Cormack et al, 1996). Esta variante también se ha optimizado a través promotores específicos que favorecen la expresión de las proteínas en células humanas en lugar de las correspondientes a las proteínas del cnidario (Chiu et al, 1996).

También se han producido las variantes EYFP (amarilla) y ECFP (azul), con el propósito de expandir sus aplicaciones hasta lograr avances tecnológicos como la fluorescencia de doble color en el doble marcaje de cultivos celulares. (Stauber et al, 1998).

Estas proteínas han sido poco estudiadas y debieran ser altamente eficientes en su uso como marcadores celulares. Se propone aumentar su eficiencia insertándolas en un vector retroviral para monitorear transgenes en sistemas celulares ***in vitro*** e ***in vivo*** en tejido ó en órganos.

OBJETIVOS GENERALES

- θ OBTENCIÓN DE VECTORES RETROVIRALES QUE EXPRESAN LAS PROTEINAS AMARILLA Y AZUL FLUORESCENTES EN UNA LINEA EMPACADORA GPE-86.

OBJETIVOS PARTICULARES :

- ♣ OBTENER UN CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA GPE-86
- ♣ TRANSFECTAR EL CULTIVO DE CÉLULAS GPE-86 CON LOS VECTORES pLNCX-ECFP-N1 Y pLNCX-EYFP-N1.
- ♣ OBTENER COLONIAS DE CÉLULAS GPE-86 QUE CONTENGAN EL VECTOR pLNCX-ECFP-N1 Y pLNCX-EYFP-N1,
- ♣ HACER UNA SUBCLONACIÓN PARA SELECCIONAR LAS COLONIAS.
- ♣ DETECTAR LA FLUORESCENCIA CELULAR POR MEDIO DE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA.
- ♣ EXPANDIR LAS CLONAS Y OBTENER EL TÍTULO VIRAL EN EL SOBRENADANTE.
- ♣ TRANSDUCIR UN CULTIVO DE CELULAS C6 CON LOS RETROVIRUS QUE EXPRESAN LAS PROTEINAS AMARILLA Y AZUL FLUORESCENTES RESPECTIVAMENTE.
- ♣ OBTENER EL TITULO VIRAL DE LAS CELULAS C6 TRANSDUCIDAS CON LOS VECTORES RETROVIRALES LN-ECFP Y LN-EYFP POR MEDIO DE CIITOMETRÍA .
- ♣ MEDIR LA INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA EMITIDA POR LAS C6 TRANSDUCIDAS POR MEDIO DE CITOMETRIA.

METODOLOGÍA

Se obtuvo previamente la construcción de un vector retroviral pLNCX-ECFP-N1 y un vector pLNCX-EYFP-N1 (Cortez et al, no publicado). Estos vectores expresan las proteínas amarilla y azul fluorescentes derivadas de la proteína verde fluorescente (GFP) de ***Aequorea victoria*** , en donde el cDNA está bajo el control transcripcional del promotor del citomegalovirus humano, CMV, que dirige la expresión de EFP en células de mamíferos. Este vector también contiene el marcador de resistencia a neomicina , la región codificante EYFP y ECFP todo dentro de las regiones de inicio y terminación viral ***LTR 5 ´y 3´.***

Se obtuvo un cultivo de células C6, donadas por el Dr. De Vellis (UCLA), las cuales son derivadas de un glioma murino . Se crecieron en medio DMEM/F-12 (GIBCO) mas 10% de suero fetal bovino (Hy Clone),según lo descrito anteriormente por (Segovia et al, 1994).

La línea celular GPE-86 (obtenida de ATCC), se creció en medio DMEM alta glucosa (GIBCO) mas 10% de suero fetal bovino (IN VITRO) dializado. Después de tres días, éste medio fue sustituido por medio DMEM alta glucosa, 10% de suero fetal bovino (dializado), 250 µg/ml de xantina, (SIGMA), 15 µg/ml de hipoxantina, (SIGMA), 150µg/ml de L-

glutamina, 10µg/ml de timidina, 2µg/ml de aminopterina, 25µg/ml de ácido micofenólico y 0.2 mg/ml de higromicina.

La línea celular GPE-86 es capaz de empacar DNA que contenga la secuencia *psi* de empaquetamiento dentro del retrovirus ecotrópico recombinante. Esta línea fue obtenida por Markowitz (1988) a partir de la linea celular NIH3T3, electroporada con dos plasmidos, uno de ellos con las regiones gag y pol del virus de la leucemia murina de Moloney y el otro con la region env del mismo virus.

Se sembraron 3 x 10^6 células GPE-86. Después de 24 horas de cultivo, se hizo la transfección con 5 µg de cada construcción empleando un reactivo comercial de

lipofectamina Plus (GIBCO). Las células control recibieron el mismo tratamiento pero sin DNA. Se transfectó un grupo control de GPE-86 con el plasmido comercial living colors (Clontech) que expresa la proteína verde fluorescente.

El medio de cultivo junto con la mezcla de transfección fue substituido con medio fresco después de transcurrir 24 hrs, después de la lipofección se agregó el medio de selección mas geneticina (GIBCO), con una concentración de (400µg/ml).

Se observaron colonias, las cuales a su vez fueron subclonadas por medio de papel filtro (millipore) con un diámetro de poro de 0.45 µ .Estas colonias fueron expandidas para su tratamiento.

Para el despegado de las células se utilizó tripsina-EDTA (0.025%) (GIBCO-BRL) durante 4 min a 37ºC. La pastilla celular se obtuvo por centrifugación a 700 rpm durante 4 min a 15-20ºC, el medio se removió por aspiración y las células se contaron utilizando un hemocitómetro. Cuando fue necesario se almacenaron en viales, a una densidad celular de $2x10^6$ /ml con DMSO al 10% a -70ºC y posteriormente en nitrógeno líquido.

Se determinó la fluorescencia amarilla que emiten las colonias por medio de microsopía confocal con un microscopio Nikon Diaphot acoplado a un sistema confocal (BIORAD) modelo MRC-620, con un filtro para la rodamina y uno para la fluoresceína, las imágenes fueron analizadas con un software CAS (Confocal Asistant) V1. La microscopía azul se detectó por medio de microscopía de epifluorescencia con un microscopio (Leica) modelo DMLS por medio de un filtro BGR-UV que selecciona longitudes de onda de 260-460 nm. Y una fuente de luz UV. Las imágenes fueron capturadas por medio de una cámara de 35 mm. Acoplada al microscopio.

Se obtuvo el retrovirus a partir del medio de cultivo de las GPE-86 transfectadas. Este se filtró con filtros 0.45 um de poro (Millipore).
Se transdujo un cultivo de células C6 con el retrovirus que expresa la proteína amarilla fluorescente y otro con el que expresa la proteína azul, a partir del sobrenadante en presencia de polybrene 4-8 ug. Posteriormente se detectó la fluorescencia que emiten las C6 transducidas por medio de citometria de flujo. Las células fueron despegadas y resuspendidas en 500 µl de PBS esteril. Se analizaron un total de 10000 células en un aparato de citometria de flujo, FACS Vantage SE BD de Bencton Dicson, con un filtro de excitación en un pico máximo de 527 nm. Y uno mínimo de 513 nm. (en la región amarilla-verde) para la proteína amarilla, la emisión se encuentra entre 509 y 527 nm.

Para la proteína azul se usó un filtro de excitación en un pico máximo de 477 nm y uno menor dee 434 nm, el espectro de emisión está dado entre las longitudes de onda 477 y 496 nm. Se usó una fuente de luz UV. Los datos fueron analizados por medio de un software (NMDI) v. 96.

Por último se determinó el título viral por medio de citometria, y a travès de diferentes diluciones del concentrado retroviral en medio DMEM-F/12 (Gibco) sin suero y sin antibiótico. (1:10, 1:100, 1:1000,). Se sembraron $1x10^6$ células (C6) en cajas Petri de 100 mm. Estas céulas fueron transducidas con las diferentes diluciones del retrovirus en presencia de polybrene (4-8 ug) , manteniendo un grupo control de células sin transducir. Las células se incubaron durante 16 horas.

Posteriormente se detectó la fluorescencia que emiten las C6 transducidas por medio de citometria de flujo. Las células fueron despegadas y resuspendidas en 500 µl de PBS esteril. Se analizaron un total de 10000 células en un aparato de citometria de flujo, FACS vantage SE BD de Bencton Dicson, con un filtro de excitación en un pico máximo de 527 nm. Y uno mínimo de 513 nm. (en la región amarilla-verde) para la proteína amarilla, la emisión se encuentra entre 509 y 527 nm.
Para la proteína azul se usó un filtro de excitación en un pico máximo de 477 nm y uno menor dee 434 nm, el espectro de emisión está dado entre las longitudes de onda 477 y 496 nm. Se usó una fuente de luz UV. Los datos fueron analizados por medio de un software (NMDI) v. 96.
Para la obtención del tìtulo viral se hizó un cálculo:

(porcentaje de células fluorescentes) X número de células sembradas x el factor de dilución

RESULTADOS

Se transfectaron las células con los plasmidos pLN-ECFP-N1 y pLN-EYFP-N1 respectivamente. Después de un tratamiento de selección se obtuvieron colonias que expresan establemente las proteínas amarilla y azul fluorescentes en la línea celular empacadora GPE-86. También se transfectaron transitoriamente un grupo de células GPE-86 control con un plasmido comercial que expresa la proteína verde fluorescente (figura 6)

Expresión de las proteínas amarilla, azul y verde fluorescentes en células GPE-86 transfectadas

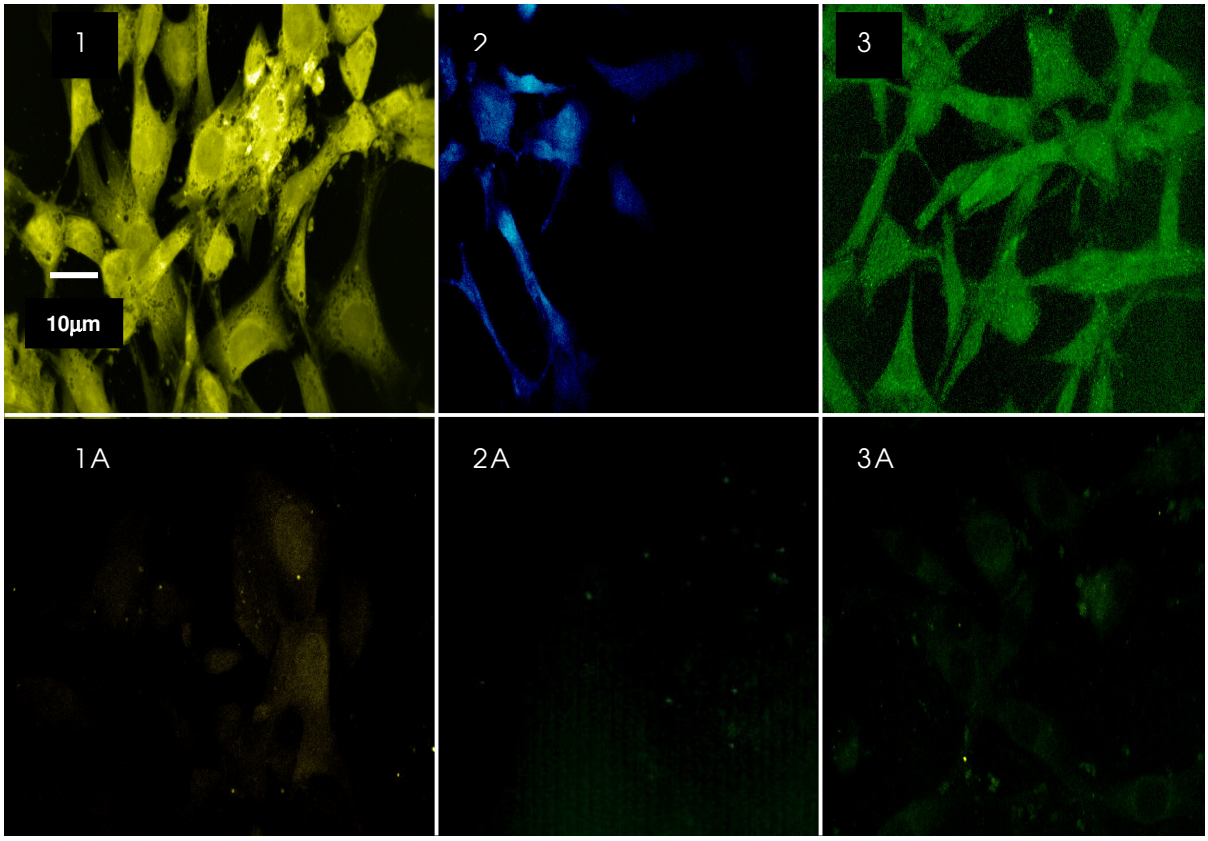
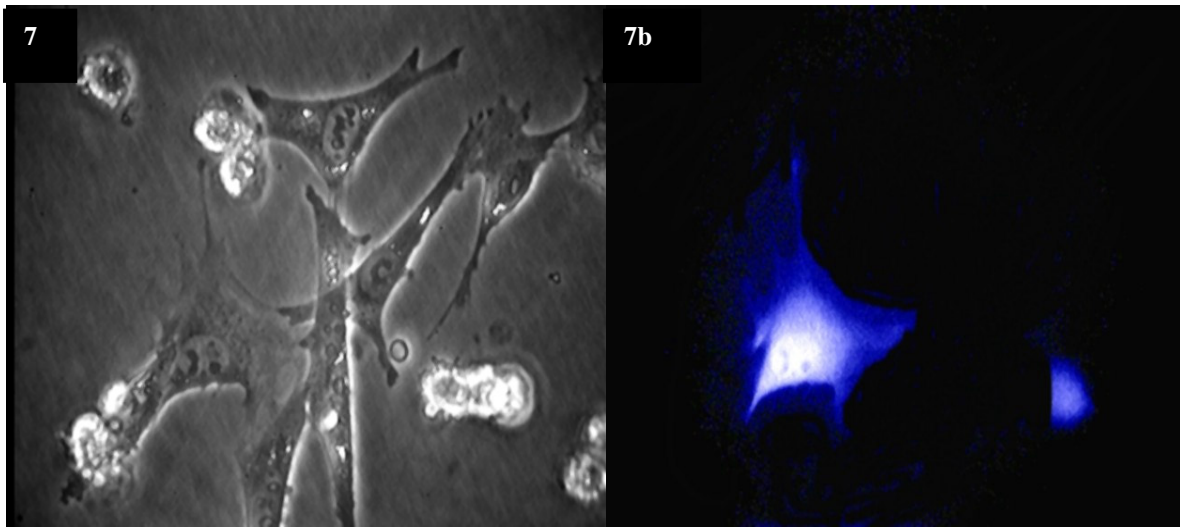


FIGURA 6 : El panel 1 muestra la expresión de la proteína amarilla fluorescente en un cultivo de células GPE-86 transfectadas, el panel 2 muestra la expresión de la proteína azul fluorescente, el panel 3 muestra la expresión de la proteína verde fluorescente. Los paneles 1A , 2A, y 3A muestran los respectivos controles de células GPE-86 sin transfectar. Las imágenes fueron tomadas por medio de microscopia de epifluorescencia con un filtro BGR que selecciona longitudes de onda de 260 a 460 nm y con un objetivo 40x.

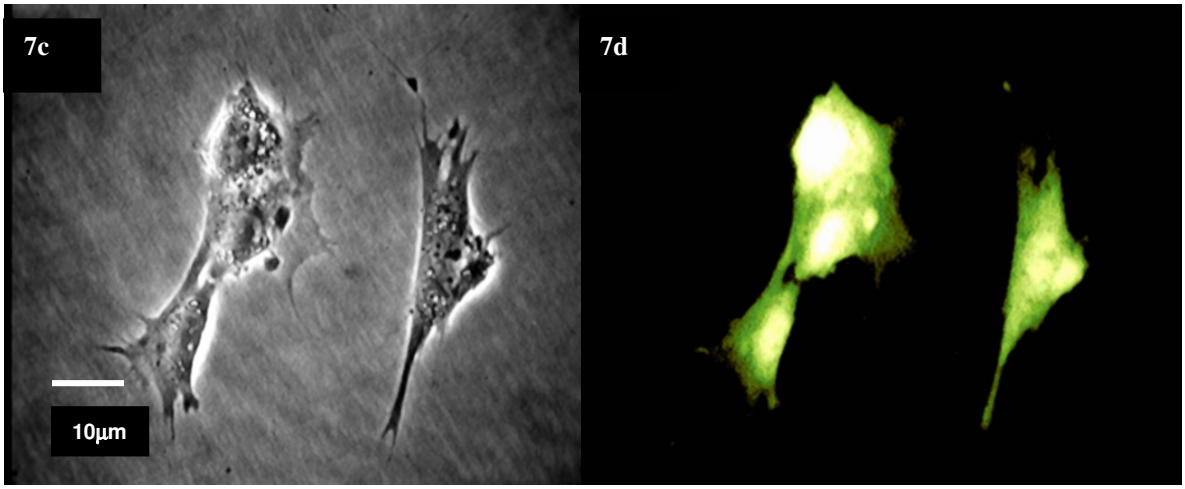
También fueron capturadas imágenes por medio de microscopía de contraste de fases, la cual nos proporciona más sobre la morfología estrellada de las células y nos permite

comprobar que la fluorescencia detectada es emitida por cuerpos celulares y no por algún artefacto. **(figura 7).**

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNAS AMARILLA Y AZUL FLUORESCENTES EN CÉLULAS GPE-86 POR MEDIO DE MICROSCOPÍA DE CONTRASTE DE FASES



El panel 7a muestra la expresión de la proteína azul por medio de microscopía de contraste de fases. El panel 7b muestra un cultivo de células GPE-86 transfectadas con el plasmado pLNX-ECFP-N1, el panel 2 muestra el mismo cultivo pero en el canal de DAPI.



El panel 7c muestra la expresión de la proteína amarilla por medio de microscopía de contraste de fases. El panel 7d muestra un cultivo de células GPE-86 transfectadas con el plasmido pLNX-EYFP-N1, el panel 2 muestra el mismo cultivo pero en el canal de la fluoresceína.

Como se muestra en la figura en la **figura 8** , a partir de las subclonas de células GPE-86 que expresan de manera estable la proteína amarilla fluorescente se obtuvo una imagen por medio de microscopía confocal, justo en el canal de la fluoresceína, por otra parte éstas células se tiñeron con azul de Evans, un colorante que tiñe tanto el núcleo como el

citoplasma.. por último se hizo la colocalización de la tinción con azul de Evans y la proteína amarilla, ésta imagen fue capturada por medio de microscopía confocal y analizada en un programa de análisis de imágenes llamado CAS (confocal assistant). Podemos observar que aunque la marca no aparece en la totalidad de las células , es muy intensa y se expresa indistintamente en toda la célula.

COLOCALIZACION DE LA PROTEINA AMARILLA FLUORESCENTE CON AZUL DE EVANS

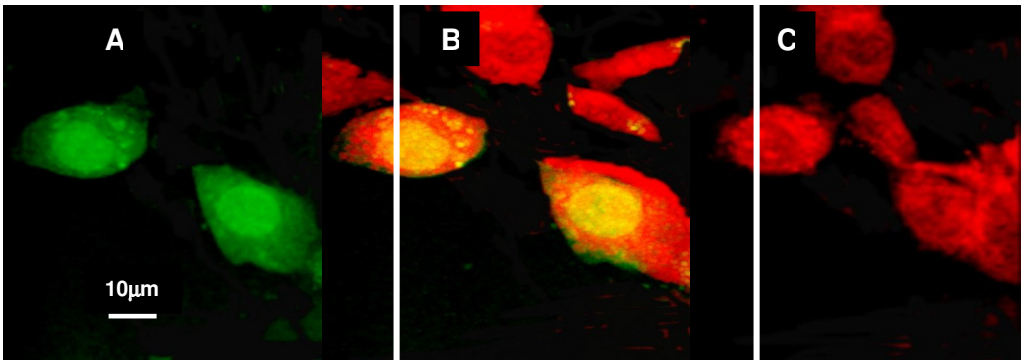


Figura 8. El panel C muestra un cultivo de células GPE-86 con tinción de evans tomada en el canal de la rodamina, el panel A muestra el mismo cultivo transfectado con el plasmido pLNCX--EYFP-N1 que expresa la proteína amarilla fluorescente tomado en el canal de la fluoresceína, el panel B muestra la colocalización de la tinción de evans y la proteína amarilla. Las imágenes fueron capturadas y analizadas por medio de microscopía confocal.

Una vez comprobada la expresión de los transgenes en las subclonas de células empacadoras GPE-86, èstas se expandiero y se obtuvo el retrovirus a travès del medio de cultivo de las células , El retrovirus se usó para transducir células C6 (derivadas de un glioma murino) y asì comprobar la eficacia del vector retroviral.

Se detectó la expresión de la proteína amarilla por medio de microscopía confocal en células C6. (Figura 9) y la expresión de la proteína azul en C6 por medio de microscopía de contraste de fases (Figura 10).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AZUL FLUORESCENTE EN CÉLULAS C6 TRANSDUCIDAS CON EL VECTOR RETROVIRAL LN-ECFP

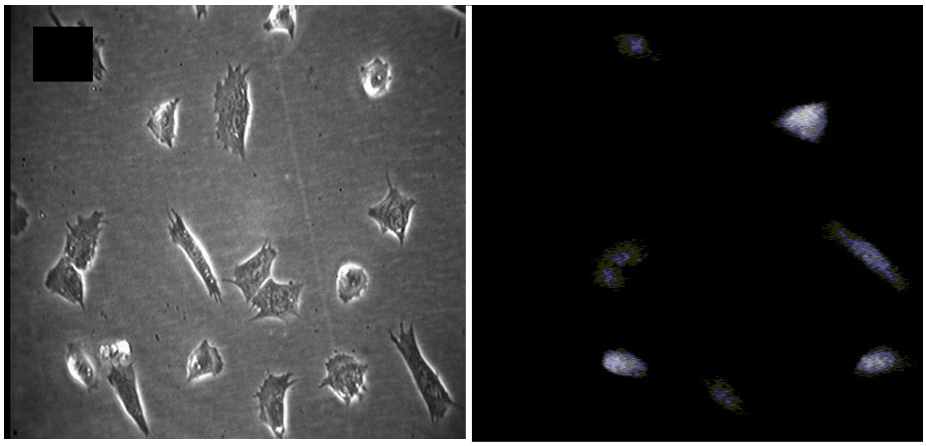


Figura 10: muestra la expresión de la proteína azul en células C6 transducidas con el vector retroviral LN-ECFP por medio de microscopía de contraste de fases con un objetivo 40X.El panel A muestra un cultivo de células C6 transducidas con el vector retroviral LN-ECFP por medio de microscoía de contraste de fases, el panel B muestra el mismo cultivo pero en el canal de DAPI.

CÉLULAS C6 TRANSDUCIDAS CON EL VECTOR RETROVIRAL LN-EYFP

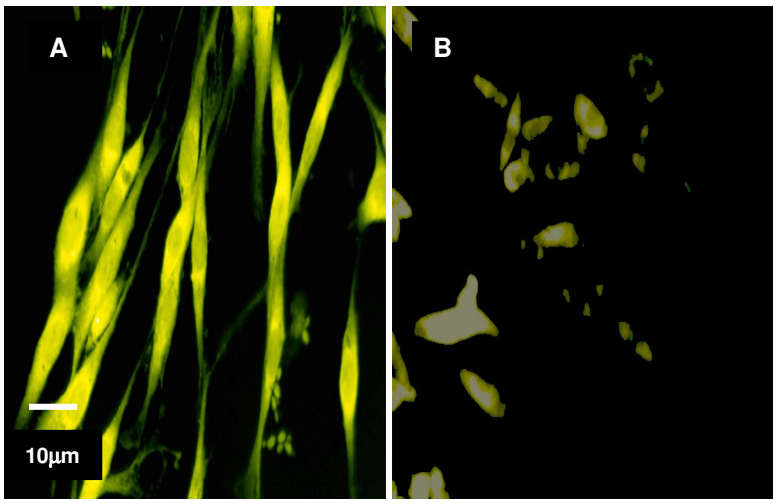
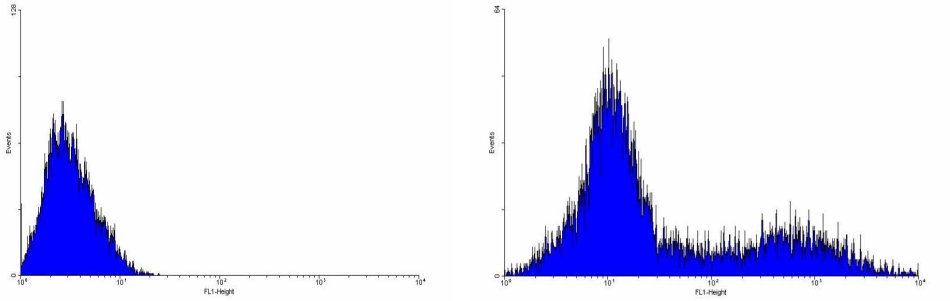


Figura 9: El panel A muestra un cultivo de células C6 transducidas con el vector retroviral LN-EYFP. El panel B muestra el control decélulas sin translucir, las imágenes fueron tomadas y capturadas por medio de microscoía confocal

También se detectó la fluorescencia emitida por las C6 transducidas con el vector retroviral LN-EYFP por medio de citometria de flujo (FACS). La figura 11 muestra los resultados obtenidos. Se observa la expresión de la proteína amarilla , en el eje de las X se observa la intensidad de la fluorescencia y en el eje de las Y se observa el número de células que están fluoresciendo.

FIGURA VI EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AMARILLA EN C6 POR MEDIO DEL FACS



1 **2**

El panel 1 muestra el análisis de células C6 sin transducir (10000 eventos), el eje de las X representa la intensidad de la fluorescencia emitida en el canal de la fluoresceína .El eje de las Y representa los eventos o células analizadas. El panel 2 muestra el análisis por medio de citometria de flujo de C6 transducidas con el vector retroviral LN-EYFP.El eje de las X representa la intensidad de fluorescencia emitida en el canal de la fluoresceína. El eje de las Y representa los eventos o células analizadas

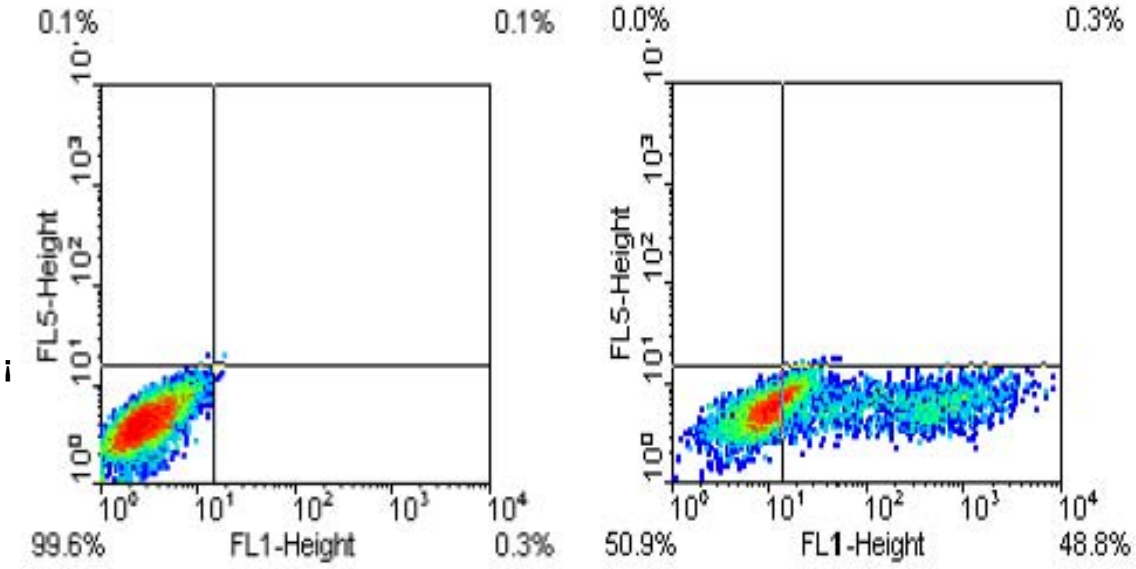
En la figura 11 podemos observar que es menor el número de células transducidas que expresan la proteína amarilla fluorescente en comparación con las células sin transducir. Además se observa un barrido en la intensidad de la fluorescencia emitida dentro de las regiones verde-amarilla , esto quiere decir que la proteína se expresa en una región amplia. Al sobreponer las dos imágenes se observa un ligero corrimiento en las células transducidas en comparación con las control, lo cual significa que todas las células transducidas están fluoresciendo más que el grupo control de células sin transducir.

La **figura 12** muestra los resultados de la lectura de citometria de flujo de células C6 transducidas con el vector retroviral LN-EYFP que expresa la proteína amarilla fluorescente para la obtención del título viral. Se transdujeron $1x10^6$ C6 durante 16 horas en una dilución 1:10 de retrovirus con medio de cultivo. Se analizaron un total de 10000 células por medio del FACS,

Para su análisis en el FACS las células fueron excitadas con un pico de excitación máximo de 513 nm. Y uno mínimo de 527 nm. (en la región amarilla-verde) dentro de la región de emisión de 509 a 527 nm.

En la **figura 12** observamos los resultados de intensidad de fluorescencia de las C6 transducidas, en el eje de las X se encuentra representada la intensidad de fluorescencia 1 que emiten las células (en el canal de la fluoresceína), mientras que en eje de las Y se representa la intensidad de fluorescencia 5 (en el canal de DAPI) que corresponde al color azul, en donde la excitación fluorescente está dada en un pico mayor de 453 nm. Y uno menor de 434 nm. El espectro de emisión está entre las longitudes de 477 y 496 nm.

1 **2**



El panel **1** muestra el control de células C6 sin transducir , aquí se observa un porcentaje de 0.23% de células que expresan la proteína amarilla, en comparación con el porcentaje de 48.88% de células fluorescentes que muestra las C6 transducidas (panel **2**). Esta diferencia es mayor, por lo tanto podemos concluir que el retrovirus además de expresar la proteína amarilla es, capaz de infectar células y mantener la expresión del transgén (En ambos cultivos no se observa fluorescencia 5). Para la obtención del título viral se realizó el siguiente cálculo:

Número de células sembradas X porcentaje de células marcadas X factor de dilución (promedio).

TITULO VIRAL= 1000000X48X0.10=4.8X 10^6 cfu/ml

DISCUSIÓN

I. Sistemas de transferencia de genes:

En la actualidad, uno de los principales retos que enfrenta la terapia génica es el de transferir de forma dirigida, eficiente y duradera los transgenes terapéuticos. Para esto es necesario el uso de promotores específicos que dirijan la expresión a ciertos tipos celulares así como de vectores eficientes que dirijan y mantengan la expresión del transgén sin dañar las células.

Como ya se mencionó anteriormente existen diferentes métodos para transferir material genético. Cabe mencionar que cada uno de esto sistemas presentan ventajas y desventajas, hasta el momento no existe uno ideal para cualquier objetivo. Para elegir el sistema mas conveniente, debemos revisar las características de cada uno de estos métodos y de las células que van a ser infectadas, también se debe poner atención en el objetivo específico: es decir, el tamaño del transgén, el tipo celular, la duración de la expresión, el número de células que van a ser infectadas y la toxicidad que pueden presentar estos sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*.

En el presente trabajo se utilizó un sistema retrovural debido a las siguientes razones:

2. El tamaño de las secuencias que codifican para las proteínas fluorescentes es de aproximadamente 4.2 Kb por lo que el inserto fue integrado sin dificultad.

3. Los retrovirus fueron fácilmente manipulados *in vitro*.

4. el genoma se integra de manera estable a la célula por lo que se pudieron obtener colonias que expresan el transgén de manera estable.

5. No presentaron ninguna toxicidad aparente en las células infectadas.

5. Estos retrovirus se usarán como marcadores de la expresión génica en implantes de transgenes en modelos de ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington.

II. Vectores retrovirales Mo MLV

Los vectores retrovirales han sido el sistema viral de transferencia de genes mas utilizado en la terapia génica. En particular los vectores basados en el virus de leucemia de murino (MLV). (Hee Kim, et al, 2000).

Las ventajas que presentan estos vectores son:

Pueden ser fácilmente manipulados *in vitro,* el genoma del vector se integra establemente en el DNA de la célula hospedera sin ninguna toxicidad aparente y pueden infectar un amplio número de células blanco. Además de ser un sistema altamente seguro, ya que los vectores derivados del Mo MLV solo infectan células de murino.

Las desventajas de este tipo de vectores retrovirales son:

Requieren de células en división para su integración, se obtienen bajos títulos virales en comparación con los vectores formados de DNA, como los adenovirus, y los virus del herpes simple, se insertan azarosamente en el genoma del hospedero lo cual puede causar mutaciones, y teóricamente, cancer. Aunque el único ejemplo conocido de enfermedad inducida por vectores retrovirales en modelos de murino y primate es causada por la presencia de virus competentes en su replicación. Además de que se necesitaría de múltiples eventos de integración, de la inactivación o alteración de oncogenes o genes supresores de tumores, los cuales son necesarios para transformar una célula. (Salmons and Gunzburg, 2000).

Además, cuando es necesario concentrar el retrovirus para probar la expresión del transgén *in vivo*, al obtenerse moderadas concentraciones de virus se requiere el uso de protocolos de concentración viral, los cuales son muy escasos, laboriosos o limitan su uso a cultivos celulares.

Un avance en el mejoramiento de los títulos virales retrovirales se ha dado al usar otras envolturas virales, por ejemplo, en un estudio reciente se probó a través de una línea empacadora (PG13) obtenida a partir de los genes *gag* y *pol* del virus MoMLV con la

envoltura de otro virus llamado (GaLV;35). Observaron que esta envoltura se unía a un receptor predominante en las células hematopoyéticas, lo cual ampliaba considerablemente el rango de infección. (Robbins et al, 2000).

Estos virus pueden ser generados a través de la expansión del rango de infección del hospedero, Esto se comprobó en un estudio en donde por medio del uso de la envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) en lugar de la envoltura normal del virus MLV; las partículas que contenían al virus VSV-G resultaron ser más estables y fueron eficientemente concentradas por medio de centrifugación obteniéndose títulos virales de hasta 10^9 cfu. Además reportaron que estos virus son capaces de infectar células de un amplio número de especies desde zebras hasta humanos. (Kim et al, 2001).

A través de una cotransfección transitoria de la línea celular 293 con un plásmido que expresa las proteínas de la envoltura del virus MLV y otro que exoresa las proteínas de la envoltura del virus VSV-G.
Estas células empacadoras producen virus de envoltura mixta es capaces de infectar células que no sean de murino gracias a que expresan la proteína VSV-G . También se ha observad una alta eficiencia de transducción en comparación con virus derivados de una de murino ΨCRIP . (Liebert et al, 1997).

En el caso del vector pLNCX, diseñado para facilitar la transferencia de cDNA y su expresión. (Según lo reportado por Miller, et al, 1989), los títulos virales que obtuvieron a partir de una transfección de células PA317, fue de entre 10^5 hasta 10^7 cfu/ml. Ellos compararon la expresión del cDNA con tres promotores diferentes: el promotor SV40 que mostró la expresión más débil, el LTR que resultó ser el mejor y el promotor CMV que resultó intermediario. Encontraron que la actividad relativa de éstos promotores depende del tipo de célula infectada y del cDNA específico inserto en el vector.

En el presente trabajo se usó como vector a pLNCX , u vector derivado del virus de la leucemia de murino de Molones, las proteínas fluorescentes se encontraron bajo el control

transcripcional de CMV. (promotor del citomegalovirus humano),al transducir células gliales se obtuvo un título viral alrededor de 10^6 cfu/ml .

III. Líneas de células empacadoras:

Los métodos para generar células empacadoras se han enfocado en reducir la producción de virus competentes en su replicación, estos objetivos han llevado a desarrollar células con múltiples alteraciones en donde aún se puedan producir las proteínas virales pero el RNA no sea empacado en viriones ni transcrito, o integrado.

Un avance importante en el diseño de estos vectores basados en el virus de la leucemia de murino de Moloney, fue el descubrimiento de que la señal de empaquetamiento del RNA en viriones se extiende antes de la región *gag* del virus en una parte del genoma llamada *psi.* , de esta manera se diseñaron vectores que conservan la región *psi*, se eliminan los genes *gag, pol y env,* y se subclonan las regiones del transgén a expresar, todo comprendido entre las regiones virales LTR 5`y 3`.

Las células empacadoras proveen los genes estructurales *gag, pol y env* en *trans.* Esto permite empacar el DNA del transgén. Un aspecto importante son las condiciones para el crecimiento óptimo de éstas células, ya que se ha demostrado que aunque todas las líneas empacadoras estables derivan de las NIH 3T3 presentan diferencias significativas en el ph y en el consumo de glucosa. (Reeves et al,2000). Aún no se sabe si las variaciones encontradas son debidas a características intrínsecas de las células parentales, si aparecen durante la generación de la célula productora ó durante el proceso de selección; o si están relacionadas a la expresión del transgén en el vector.

En el caso de las células GPE-86 se observó que presentan un crecimiento óptimo en medio con alta glucosa + suero dializado (IN VITRO). Al llegar a una máxima confluencia y ser seleccionadas con el medio que contenía ácido micofenólico disminuía considerablemente su crecimiento, incluso podrían permanecer semanas sin crecer hasta llegar a morirse. Una alternativa para optimizar su crecimiento fue mantenerlas en medio alta glucosa, por tres semanas y posteriormente agregarles el medio de selección , al ver que la mayoría de las células moría se volvió a agregar medio sin selección hasta verlas

confluentes, (dos semanas aproximadamente) y así hasta que permanecieran resistentes al medio de selección.

IV. Proteínas fluorescentes

La proteína verde fluorescente (GFP), obtenida del cnidario ***Aequorea cnidaria***, se ha convertido en el marcador de la expresión génica más usado. Actualmente su éxito recae en que al presentar una fluorescencia intrínseca a la estructura primaria de una proteína, no necesita de sustratos fluorogénicos, de reacciones histoquímicas o de anticuerpos para reconocerla. Ademàs de presentar una fluorescencia aparentemente estable.

Las proteínas amarilla y azul fluorescentes son variaciones de la GFP. En este trabajo se usaron los plasmidos pLNCX-ECFP-N1 que expresa la proteína azul y pLNCX-EYFP-N1 que expresa la proteína amarilla. Se transfectaron en células empacadoras GPE-86, obteniéndose así los retrovirus. Se detectó la fluorescencia que emiten las células para ver la expresión de los transgenes. En el caso de la proteína amarilla siempre fue fácilmente detectada pues la fluorescencia que emite es muy intensa y se presentó en la mayoría de las células que se analizaron, aunque cabe mencionar que pudo observarse la fluorescencia en diferentes tonalidades de amarillo hasta verde. Lo mismo se observa en los datos de citometria que muestran un barrido entre las longitudes del verde- amarillo. Esto puede explicarse debido a que el espectro de excitación de la proteína amarilla es muy cercano a la región verde.

En el caso de la proteína azul se detectó con más dificultad y se observó que la cantidad de células marcadas fue menor en comparación con las colonias amarillas. Esto puede deberse a la estructura de la proteína que es más difícil detectar o que el filtro utilizado no fue el optimo.

Estos retrovirus se usaron para transducir células de origen glial y comprobar así su eficiencia de infección. En el caso de la proteína amarilla se detectó la fluorescencia por medio de microscopía de fluorescencia y citometria, en comparación con el grupo control ambos resultados muestran una transducción eficiente, éstos datos concuerdan con lo

observado por (Angres et al ,2000), quienes reportan un 55% de células marcadas (PA317) al ser transducidas con un vector retroviral que expresa la proteína amarilla fluorescente .

En el caso de la proteína azul se detectó fluorescencia en las células transducidas, por medio de microscopía de fluorescencia, sin embargo no fue dedtectada fluorescencia por medio de citometria. Esto pudo deberse a que el filtro utilizado no fue el adecuado para seleccionar el espectro específico de excitación. De acuerdo a un estudio realizado por (Beavis et al, 1999), en donde detecta la expresión de la proteína verde fluorescente, la azul y la amarilla por medio de citometria de flujo usando longitudes de excitación de 458 , 488 y 514 nm. Respectivamente. Señala que es necesario separar las señales fluorescentes por medio de un filtro óptico de configuración dicroica: 525 nm. De paso corto y 500 nm.de paso largo (EYFP), 480/430 (ECFP) y 510/20 (EGFP). También sugiere el uso de un filtro bloqueador de laser a 458 nm. Cabe mencionar que para este procedimiento es necesario de un equipo de citometria de flujo con un laser con una fuente de argón que pueda ser excitado a 488 nm.

En este trabajo se usó un filtro de excitación en un pico máximo de 527 nm. Y uno mínimo de 513 nm. (en la región amarilla-verde) para la proteína amarilla, la emisión se encuentra entre 509 y 527 nm. Para la proteína azul se usó un filtro de excitación en un pico máximo de 477 nm y uno menor de 434 nm.

En este estudio se obtuvieron vectores retrovirales que expresan las proteínas amarilla y azul fluorescentes en células gliales por medio de la transfección estable de células empacadoras GPE-86. Estos retrovirus fluorescentes pueden usarse ampliamente como marcadores celulares, en la detección de eventos celulares dinámicos, como genes reporteros o en la detección de la expresión de diferentes transgenes por medio de la tecnología de doble marcaje.

Estos marcadores serán usados para detectar la expresión génica en implantes de transgenes en modelos de ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron clonas estables de las células GPE-86 transfectadas con los plasmidos pLNCX-EYFP-N1 y pLNCX-EYFP-N1.

2. Se observó la expresión de las proteínas amarilla y azul fluorescentes en una línea celular empacadora GPE-86 por medio de microscopia de fluorescencia y confocal.

3. Se obtuvieron los vectores retrovirales fluorescentes LN-EYFP y LN-ECFP.

4. Se comprobó la eficacia del retrovirus que expresa la proteína amarilla fluorescente en una línea de células gliales, las cuales funcionan como marcadores celulares.

5. Se detectò la fluorescencia amarilla que emiten las C6 por medio de citometria .

6. Se obtuvo el título viral por medio de citometria.

REFERENCIAS

Anderson, W.F., 1992. Human gene Therapy. Science 256:808-813.

Baltimore. Et al . Molecular Cell Biology .2000. Freeman co. 4ta. USA.

Bierhuizen, M.F.Westerman, Y., Visser, T.P. Dimjati, W., Wognum, A.W., and Wagemaker, G., 1997. Enhanced Green Fluorescent Protein as selectable marker of retroviral mediated gene transfer in inmature hematopoietic bone marrow cells. Blood. 90:3304-3315.

Cashion, L.M., Bare, L.A., Harvey, Q., Trihn, Y., Zhu and Devin, J.J.1999. Use of Enhanced Geen Fluorescent Protein to Optimize and Quantitate Infection of Target Cells with Recombinant Retroviruses. BioTechniques 26:924-930.

Chalfie, M., Tu, Y.,Euskirchen, G., Ward, W.W. Prasher D.C.1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802-805.

Cheng, L., FU, J:, Tsukamoto. A. and Hawley, R.G. 1996. Use of Green Fluorescent Protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. Nature Biotech. 14, 606.

Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, Y.1996.Use of retroviral vectors in gene therapy. Current Biology. 6, 325-330.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. 1996. FACS -optimized mutants of the green fluorescent protein (EGFP). Gene, 173: 33-38.

Dardalhon, V., Noraz, N., Pollok, K., Rebouissou , C., Boyer, M., Bakker, Q. A. Spits, H., Taylor, N.1999 .Green Fluorescent Protein as a Selectable Marker of Fibronectin-Facilitated Retroviral Gene Transfer in Primary Human T Lymphocytes. Hum Gene Ther 10:5-14.

Dunbar, C.E., Cottler, F.M., O´Shaughnessy, J.A., Doren, S,. Carter, C., Berenson,R., Brown, S., Moen, R.C., Greenblat, J., and Stewart, F.M. 1995. Retrivirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. Blood 85:3048-3057.

Duprex, P.W., McQuaid S., Roscic-Mrkic B., Cattaneo, R., Mc Callister C., and Rima K.B. 2000.In vitro and in vivo infection of Neural Cells by a recombinant Measles Virus Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein.J of Virol 74:17, 7972-7979.

Flasshove, M., Bardenheur, W., Shneider, A., Hirsch, G., Bach, P., Bury, C., Moritz, T., Seeber, S., Opalka, B. 2000. Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene.Cancer Res clin oncol.126:391-399.

Gerstmayer, B., Groner, B., Wels, W., Schhnierle B.S. 1999. Stable expresion of ecotropic Retrovirus receptor in amphotropic packaging cells facilitates the transfer of recombinant vactors and enhancers the yield of retroviral particles. J Virol Methods.81:121-125.

Gunzberg, W. H., Feuchaus, A., Saller, R., and Salmons, B. 1996. Retroviral vector targeting for gene therapy. Cyokines Mol. Ther. 2, 177-184.

Hanazono, Y., Yu, J.M., Dunbar, C.E., Emmons, R.V.B.1997. Green Fluorescent Protein retroviral vectors: low titer and high recombination frecuency suggest a selective disadvantage. Hum Gene Ther 8:1313-1319.

Kitt, P., Adams, M., Kondepudi, A., Gallagher, D., and Kain, S., 1995.Green Fluorescent Protein (GFP): a novel reporter for monitoring gene expression in living cells and organisms. Clontechniques 10(1):1-2.

Kotani, H., Newton B.P., Zhang, S., Chiang, Y.L., Otto E., Weaver, L., Blaese M.L., Anderson, W.F., McGarrity J.G.1994. Improverd Methods Of Retroviral Vector Transduction and Production for Gene Therapy.Hum Gene Ther 5:19-28.

Levy,J.P., Muldoon, R.R., Zolotukhin, S., and Link, C. 1996. Retroviral transfer and expression of a humanized, red shift fluorescent protein gene in to human tumor cells. Nature Biotechnol. 14:610-614.

Lewin, B., Genes VI. 1998. Oxford Press University . USA.

Maniatis, T. et al. Regulation of Inducible and Tissue-Specific Gene Expression, Science 236:1237-1245, 1987.

Markowitz, D., Goff, S., and Bank,A., 1988. A safe packaging line for gene transfer: Separating genes on two different plasmids. J. Virol 62,1120-1124.

McLachlin, J.R., Cornetta, K., Eglitis, M.A., and Anderson, W.F., Retroviral-mediated Gene Transfer. Prog Nucleic Acid Res. MOl Biol 38:91-135.

Nolan, G.P., Fiering, S., Nicolas, J.F., and Herzenberg, L.a., 1988. Fluorescence -activated cell analysis and sorting of viable mmamalian cells based on B-galactosidase activity after transduction of E. coli lacZ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2603-2607.3

Pinkerton A.C., michel K., Obrochta D.A., Atkinson P.W. 2000. Gene Fluorescent protein as a genetic marker in transgenis Aedes aegypti. Insect Mol Biol 9:1,1-10.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.G.1992. Primary structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. Gene 111:229-233.

Robbins, P.D.,Tahara, H.,Mueller, G. M.., Hung, G., Bahnson, A., A. Zitvogel, L., J., Galea-Lauri, Ohashi, T., T., Patrene, K., Boggs, S, S., Evans, C, H., Barranger, J.A., and Lotze., M.T.(1993) retroviral vectors for use in human gene therapy for cancer, Gaucher disease, and arthritis, in Gene Therapy for Neoplastic diseases.Ann N.Y. Acad. Sci. 716,72-89.

Salmons, B., Moritz-Legrand, S., jGarcha, I., and Günzburg, W.H. 1989. Construction and characterization of a packaging cell line for MMTV-based retroviral vectors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 1191-1198.

Salmons B., Gunzburg H.W. 1993. Targeting Of Retroviral Vectors for gene Therapy. Hum Gene Ther 4:129-141.

Saylors R.L., Stine K.C., Derrick J.1999. Hematopoietic cytokine-inducible gene expression from retroviral vectors. Gene Ther 6:5,944-946.

Stauber, R.H., Horie. K., Carney, E.A., Hudson, N.I., Tarasova, G.A., Gaitanaris and Pavlakis, G.N. 1998. Development and Aplications of Enhanced Green Fluorescent Protein Mutants.Biotechniques 24:462-471.

Yang, T.T., Cheng L, and Kain S.R.,1996. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensivity with the green fluorescent protein. Nucleic acid res 24:4592-4593.

Yeh, E., Gustafson, K., and Boulianne.1995..Green Fluorescent Protein as a vital marker and reporter of gene expression in Drosophila. Proc. Natl. Acad.Sci.USA.92:7036-7040.

Zhang, G., Gurtu, V., And Kain, S.R. 1996. An Enhance Green Fluorescent Protein Allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 227:707-711.

Zolotukhin, S., Potter M. Hauswirth, W.W., Guy, J., and Mucyczka N. 1996. A "Humanized Green Fluorescent Protein cDNA adapted for High level expression in Mammalina cells. J of Virology.